



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

FLORE

Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

Parametri fotosintetici da fluorescenza variabile modulata (PAM)

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

Original Citation:

Parametri fotosintetici da fluorescenza variabile modulata (PAM) / Lazzara L.; Saggiomo V.; Fani F.; Mangoni O.; Santarpia I.. - STAMPA. - (2010), pp. 345-352.

Availability:

This version is available at: 2158/373992 since:

Publisher:

SIBM, ISPRA

Terms of use:

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

Publisher copyright claim:

(Article begins on next page)



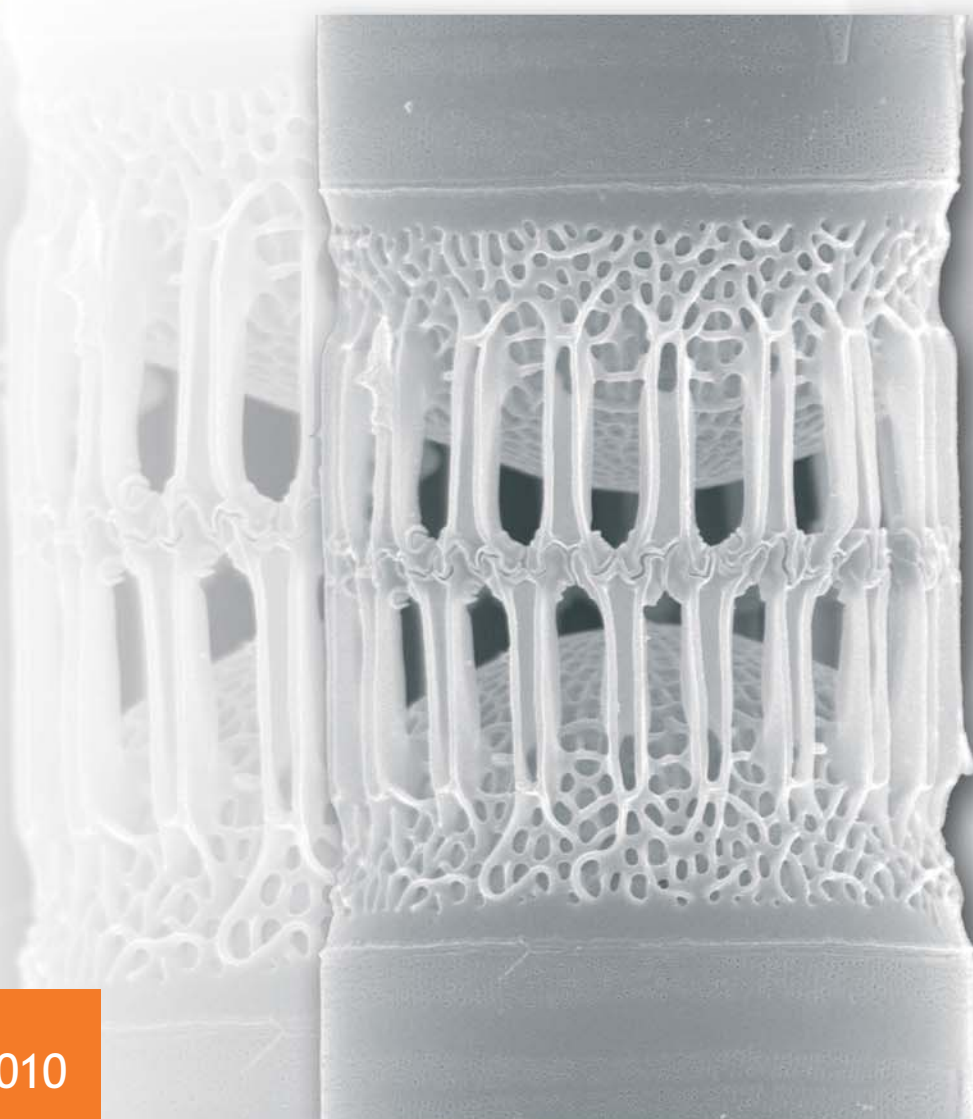
ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Metodologie di studio del Plancton marino

MANUALI E LINEE GUIDA





ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Metodologie di studio del plancton marino

edito da

Giorgio Socal¹, Isabella Buttino², Marina Cabrini³, Olga Mangoni⁴,
Antonella Penna⁵, Cecilia Totti⁶

1 Istituto di Scienze Marine CNR, Venezia

2 Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli - indirizzo corrente: ISPRA, Livorno

3 Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, Trieste

4 Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione di Zoologia, Università degli Studi Federico II, Napoli

5 Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sezione Biologia Ambientale, Università di Urbino

6 Dipartimento di Scienze del Mare. Università Politecnica delle Marche, Ancona

Gli editori e gli autori tutti dedicano questo volume alla memoria dei compianti
Elvezio Ghirardelli e Donato Marino

Manuali e Linee Guida 56/2010

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA – Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida 56/2010

ISBN 978-88-448-0427-5

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica
ISPRA

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto di copertina: Foto al Microscopio elettronico a scansione della diatomea *Skeletonema japonicum* di Maria Saggiomo, eseguita presso la Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli

Coordinamento tipografico:

Daria Mazzella
ISPRA - Settore Editoria

Amministrazione:

Olimpia Girolamo
ISPRA - Settore Editoria

Distribuzione:

Michelina Porcarelli
ISPRA - Settore Editoria

Impaginazione e Stampa

Tipolitografia CSR - Via di Pietralata, 157 - 00158 Roma
Tel. 064182113 (r.a.) - Fax 064506671

Finito di stampare giugno 2010

COMITATO DI LETTURA

I seguenti colleghi, nell'ambito delle proprie competenze hanno effettuato la lettura critica dei diversi Capitoli di questo manuale. A tutti il ringraziamento più sentito della SIBM, di ISPRA e degli editori per aver contribuito con il loro attento e qualificato lavoro al miglioramento della qualità, scientifica e chiarezza dei testi

Fabrizio Bernardi Aubry	ISMAR CNR Venezia
Alfredo Boldrin	ISMAR CNR Venezia
Giancarlo Campesan	ISMAR CNR Venezia
Raffaella Casotti	SZN Napoli
Federica Cerino	INOGS Trieste
Roberto Danovaro	Università Politecnica delle Marche Ancona
Paola Del Negro	INOGS Trieste
Serena Fonda Umani	Università degli Studi di Trieste
Rosabruna La Ferla	IAMC CNR Messina
Luigi Lazzara	Università degli Studi di Firenze
Priscilla Licandro	SAHFOS Plymouth UK
Antonella Lugliè	Università degli Studi di Sassari
Elena Manini	ISMAR CNR Ancona
Rossella Pistocchi	Università di Bologna
Ermelinda Prato	IAMC CNR Taranto
Alessandra Pugnetti	ISMAR CNR Venezia
Maurizio Ribera d'Alcalà	SZN Napoli
Chiara Santinelli	IBF CNR Pisa
Diana Sarno	SZN Napoli
Alfonso Toscano	SZN Napoli
Annamaria Zoppini	IRSA CNR Roma

Gli editori ringraziano la dr. Emanuela Spada di ISPRA per l'assistenza fornita durante la preparazione del manuale

Premessa

È con vivo piacere che, al termine del mio mandato da Presidente della Società Italiana di Biologia Marina, vedo realizzata la pubblicazione di un volume tanto atteso dalla comunità scientifica italiana. Il vecchio Manuale del Plancton, dovuto all'impegno del caro socio Mario Innamorati, era stato superato non già nell'impostazione metodologica quanto piuttosto nei contenuti tecnici dovuti all'avanzamento delle conoscenze. Era quindi ora che venisse pubblicato un nuovo volume contenente tutto quanto occorre conoscere per poter effettuare ricerche di eccellenze sul plancton. E questa richiesta avanzata non soltanto da me in qualità di Presidente ma da tutto il Consiglio Direttivo della SIBM, ha trovato nell'amico e collega Giorgio Socal la persona adatta, capace di catalizzare le migliori competenze scientifiche nazionali nel comporre un'opera così maestosa ed indispensabile come questa. Il percorso della Società Italiana di Biologia Marina si corona pertanto di un nuovo traguardo raggiunto: dopo il prestigioso volume del Manuale del Benthos, di cui è stata redatta e pubblicata anche l'edizione in inglese, ora con questo volume sul plancton si può dire che la SIBM sia in grado di svolgere un ruolo non facilmente sostituibile a livello nazionale nel campo della Biologia Marina. Il testo appena prodotto sul Plancton rappresenta infatti il punto di riferimento per qualsiasi attività, dal monitoraggio alla ricerca, che vede coinvolta la comunità planctonica. Un grazie sentito va all'APAT, oggi ISPRA, che nelle persone del dott. G. Boeri e dell'Ing. S. Corsini *in primis*, hanno compreso l'importanza fondamentale di questa opera ed hanno pertanto deciso di contribuire in maniera sostanziale alla pubblicazione del volume che esce infatti a due nomi (ISPRA e SIBM).

Nell'augurarmi che ci possa essere a breve l'edizione inglese del presente volume, in grado di dare visibilità internazionale ai due Enti sopra citati che l'hanno prodotto, come Presidente SIBM termino ringraziando tutti gli Autori dei testi che hanno messo a disposizione dell'intera comunità scientifica nazionale le loro indiscusse competenze.

ANGELO TURSI
PRESIDENTE SIBM

Mi è particolarmente gradita l'occasione di presentare questa pubblicazione sulle **“Metodologie di studio del plancton marino”** a cura della SIBM che segue la prima pubblicazione a cui ISPRA ha partecipato: “Manuale sulle metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo”.

Il presente manuale rappresenta un aggiornamento delle metodologie di monitoraggio attraverso nuove tecnologie applicate nella moderna oceanografia biologica, rivolta all'ambiente di mare aperto ed a quello costiero e di transizione e proposte a livello internazionale e offre un valido contributo allo studio del plancton marino.

Uno dei pregi di tale volume è quello di utilizzare testi facilmente interpretabili che favoriscono la riproducibilità delle metodologie di analisi, oltre a rappresentare un utile strumento sia per le istituzioni italiane di ricerca che studiano le problematiche legate all'ecologia del plancton marino, sia per gli enti locali quali regioni, ARPA, province e comuni, che svolgono attività di monitoraggio ad ampia scala spazio-temporale.

ING. EMILIO SANTORI
SUBCOMMISSARIO ISPRA

CAPITOLO 31. PARAMETRI FOTOSINTETICI DA FLUORESCENZA VARIABILE MODULATA (PAM)

L. Lazzara, V. Saggiomo, F. Fani, O. Mangoni, I. Santarpia

luigi.lazzara@unifi.it

31.1. INTRODUZIONE

Le misure di fluorescenza variabile modulata costituiscono un metodo di stima del tasso di fotosintesi alternativo a quelli per scambio gassoso, specifico per gli organismi capaci di fotosintesi ossigenica (nei quali solo la clorofilla *a* del fotosistema PSII emette fluorescenza nel rosso), molto sensibile e non invasivo. *In situ* le misure della concentrazione di ossigeno e anidride carbonica presenti nel mezzo acquoso non sono specifiche per i produttori primari: da un lato sia fitoplancton che macroalghe producono ossigeno e fissano anidride carbonica, dall'altro zooplancton, benthos, necton e gli stessi produttori primari respirano, risulta perciò spesso difficile quantificare in modo univoco il tasso di fotosintesi della popolazione fitoplanctonica nella colonna d'acqua. Le misure di fluorescenza variabile sono invece attribuibili esclusivamente agli organismi fotoautotrofi (gli altri componenti del mezzo contribuiscono alla fluorescenza totale in modo trascurabile, con diverse caratteristiche spettrali e comunque non con una componente "variabile"). Infatti è la clorofilla *a* del fotosistema PSII, presente in tutti gli organismi capaci di fotosintesi ossigenica, ad emettere la maggior parte della fluorescenza a temperatura ambiente.

I fluorimetri tradizionali sono dotati di una sorgente di luce nel blu-verde, mentre al rivelatore sono preposti dei filtri colorati che lasciano passare solo luce rossa emessa. La fluorescenza emessa è quindi proporzionale alla radiazione assorbita che dipende anche dalla luce attinica ambientale (Schreiber *et al.*, 1986). Questi limiti sono superati dai fluorimetri a impulsi modulati, in cui la debole sorgente modulata di intensità costante ($1-2 \mu\text{E m}^{-2}\text{sec}^{-1}$) è incapace di indurre fluorescenza variabile mentre il detector rileva solo i segnali modulati, dotati della stessa frequenza e della stessa fase della sorgente. Questo fa sì che l'emissione di fluorescenza sia indipendente dall'irradianza attinica, cioè dalla luce continua presente nell'ambiente, indipendentemente dalla sua intensità (Geider e Osborne, 1992).

Dalle misure dei tassi di fotosintesi per fluorescenza ad impulsi modulati (*Pulse Amplitude Modulated*) effettuate in un gradiente di luce ambientale, si possono quindi ottenere curve analoghe alle curve produzione - irradianza (curve PE) derivate da misure di scambi gassosi e stimare analoghi parametri fotosintetici (α , P_{max} , E_k e β , vedi Capitolo 30).

31.2 PRINCIPIO DEL METODO

Fluorescenza, reazioni fotochimiche ed emissione di calore competono per l'uso dell'energia assorbita dai sistemi antenna dell'apparato fotosintetico. La diminuzione di fluorescenza è detta quenching ed il quencher è la molecola di plastochinone accettrice di elettroni nella catena di trasporto plastidiale. La fluorescenza dipende dallo stato di ossidazione del quencher infatti, quando il plastochinone è in forma ossidata, il centro di reazione è aperto, assorbe un fotone e poi si ossida cedendo un elettrone al quencher. Il centro di reazione è ora chiuso, non in grado di accettare elettroni, dunque è molto più probabile che l'energia in eccesso sia emessa per fluorescenza (Falkowski e Raven, 1997). La fluorescenza dunque è massima (F_m) se tutti i centri di reazione hanno il plastochinone ridotto ed è minima (F_o) se il plastochinone è ossidato.

L'adattamento di un campione al buio, o ad una radiazione nel rosso lontano, apre tutti i centri di reazione, così è molto probabile che una luce di intensità bassa ($<1-2 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), tale da non attivare i processi fotochimici (measuring light) determini un'emissione di fluorescenza minima, F_o (Fig. 1). Per

determinare un'emissione di fluorescenza massima F_m , si invia, al campione, un impulso saturante, ovvero una luce molto intensa (almeno $800-1000 \text{ E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ma di breve durata (compresa tra gli 0,3 e gli 1,2 sec, ma generalmente 0,6-0,8 sec), capace di saturare tutti i fotosistemi senza modificare la dissipazione di energia in calore, né produrre variazioni irreversibili di efficienza fotochimica. La differenza tra F_m ed F_o è la fluorescenza variabile massima o F_v (Krause e Weis, 1991).

Al buio una luce attinica costante (fotosinteticamente attiva e non saturante) determina un aumento immediato di fluorescenza (Kautsky *et al.*, 1960). Quando l'attinica ha chiuso i centri di reazione, la fluorescenza diviene costante e pari a F_t (Fig.1), per quel valore di luce attinica (Geider e Osborne, 1992). La luce chiude parte dei centri di reazione e, se è sufficientemente intensa da far sì che la velocità di riduzione dei chinoni sia maggiore di quella di riossidazione, la probabilità che sia emessa fluorescenza è alta ed $F_t > F_o$. Inviando un impulso saturante, la fluorescenza aumenta fino al valore massimo F_m' per poi decadere a F_t (per una review, vedi Maxwell e Johnson, 2000). In genere $F_m' < F_m$ perché l'attinica attiva i meccanismi di dissipazione di energia, ed $F_t > F_o$ perché alla luce alcuni centri di reazione si chiudono. In realtà, nelle microalghe si può anche misurare $F_m' > F_m$ con luce attinica $< 100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e ciò sarebbe dovuto ad una rapida riorganizzazione delle antenne (Mouget e Tremblin, 2002).

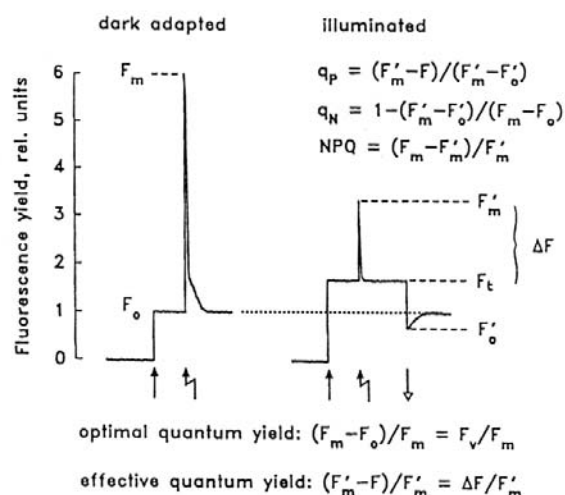


Fig. 1 - Variazioni temporali della fluorescenza variabile in organismi fotosintetici e terminologia dei parametri di fluorescenza (F_o , F_m , F_t ed F_m'). Nota che F_o' è utilizzato nella quenching analysis per il calcolo dei parametri q_p e q_N (ridisegnata da Schreiber *et al.*, 1995).

31.2.1 Terminologia e definizioni

La diminuzione di fluorescenza (*quenching*) può essere di tipo non fotochimico (NPQ) e fotochimico (PQ).

Il *quenching* non fotochimico è legato ai meccanismi di fotoprotezione / fotoinibizione, quindi alla conversione di parte dell'energia in calore:

- **NPQ** (*non - photochemical quenching* di fluorescenza) quantifica il *quenching* di F_m alla luce attinica e può essere quantificato secondo Bilger e Björkman (1990) con la seguente formulazione:

$$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$$

Esso é linearmente proporzionale all'emissione di calore (Schreiber *et al.*, 1995) e nelle piante ha un valore compreso tra 0 e 0,5-3,5 a luce saturante.

- **PQ** (*photochemical quenching*) indica la frazione di energia effettivamente utilizzata per la fotosintesi, è causato dallo smaltimento dei chinoli ed è quantificabile per mezzo dei seguenti parametri: Fv/Fm, Yield ed ETR (*Electron Transport Rate*, vedi oltre).
- **Fv/Fm** è l'efficienza potenziale massima (*optimal quantum yield*) di cattura della luce da parte del PSII ed è, quindi, legato allo stato funzionale dell'apparato fotosintetico (Krause e Weis, 1991):

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m}$$

in condizioni ottimali Fv/Fm è pari a 0,7-0,8; valori inferiori indicano *stress* di varie origini.

- **Yield (Y)** è il rendimento quantico del trasporto elettronico al PSII a PAR≠0 (*effective quantum yield*), ed è espresso da Fv'/Fm' (Rohacek, 2002):

$$Y = \frac{F_m' - F_t}{F_m'}$$

Quindi il rendimento quantico di trasporto elettronico si stima misurando la fluorescenza emessa dai PSII (Genty *et al.*, 1989).

- **ETR** (*Electron Transport Rate*) è la velocità di trasporto elettronico (Falkowski e Raven, 1997) ottenuta dal prodotto del rendimento y con il flusso fotonico PAR:

Inoltre, particolarmente per le sospensioni microalgali, va introdotto nel calcolo del flusso elettronico assoluto da fluorescenza, come proposto da Hartig *et al.* (1998), il coefficiente di assorbimento specifico medio (*) per unità di clorofilla *a* (vedi Capitolo 35). Si ottiene così l'indice di produzione primaria PPR (*Primary Productivity Rate*):

$$PPR = ETR \text{ PAR} \cdot *$$

Misurando il tasso di trasporto elettronico a diverse intensità luminose è possibile quindi ottenere curve di produzione irradianza (curve PE) ed i relativi parametri fotosintetici (alpha, Pmax, Ek, beta). Da notare che le curve PE da fluorescenza variabile non hanno mai valori negativi, perché ETR è sempre ≥0 e, quindi, non si può apprezzare l'equivalente di una intensità di compensazione (Ec).

31.3 PROCEDURA

31.3.1 Strumentazione

I fluorimetri ad impulsi modulati misurano i parametri Fo, Fm, Ft, Fm' e consentono di calcolare i parametri di fluorescenza e di conseguenza quelli fotosintetici.

Il fluorimetro PAM-101/102/103 (Pulse Amplitude Modulation, della Walz) è uno dei primi e più diffusi fluorimetri ad impulsi modulati. Possiede un diodo (L450, L590 o L655) che emette una luce di eccitazione pulsata (measuring light, con frequenza da 1,6 a 100 KHz) ed un rivelatore (ED 101-US o

PM-101) munito di filtri passa-alto (Schott RG9) che rileva ed amplifica, selettivamente, solo il segnale pulsato di fluorescenza. L'unità PAM 101 controlla l'intensità della *measuring light* e l'intensità, la frequenza e la durata dell'impulso saturante; rileva e amplifica il segnale di fluorescenza e lo invia all'unità digitalizzatrice PDA-100. Il campione fitoplanctonico da analizzare è posto in una cuvetta a base quadrata di quarzo con cammino ottico di 1 cm. La cuvetta è chiusa dall'alto dal sensore sferico di PAR del quantametro (LI-250, LI-COR) e le terminazioni delle fibre ottiche sono a contatto diretto con le pareti della cuvetta. Una di queste terminazioni convoglia la luce attinica proveniente da una sorgente esterna (esempio KL-1500) ed un'altra la luce di saturazione proveniente da una seconda sorgente (KL-1500 o HPL-L470).

Il fluorimetro PHYTO-PAM (Walz) utilizza invece contemporaneamente 4 diodi in eccitazione (L470, L520, L645, L665) ed il detector rileva, separatamente, i 4 segnali di risposta in fluorescenza. Questo, se opportunamente corretto, consente di distinguere e quantificare il contributo di tre principali gruppi fitoplanctonici (cloroficee, diatomee e cianobatteri) al segnale di fluorescenza in un popolamento naturale. Il PHYTO-PAM, oltre alla *measuring light*, può essere dotato di un altro diodo (PHYTO-AL) in grado di emettere luce attinica anche ad alta intensità (fino a $2000 \text{ E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ circa) e che si colloca a 180° rispetto all'altra sorgente. Il suo fotomoltiplicatore (PM-101P) è munito di uno speciale set di filtri che include oltre all'RG9, anche una combinazione di BG3, R65 e RG9 che garantiscono migliori prestazioni.

31.3.2 Misura delle curve PE col metodo dell'impulso saturante

Il campione è mantenuto al buio fino al momento della misura (comunque almeno 3-5 minuti), l'intensità della *measuring light*, scelta attraverso la regolazione del settaggio, deve essere $<1 \text{ E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$. Dopo tale esposizione viene inviato il primo impulso saturante, quindi misurati F_0 ed F_m . Il campione è ora illuminato con luce attinica e mantenuto a tale intensità luminosa per un determinato periodo di tempo (vedi la discussione successiva), segue il secondo impulso saturante e la simultanea misura di F_t e F_m' a quella PAR, poi l'esposizione ad una terza intensità luminosa, e così via per l'intero gradiente previsto. I valori di ETR misurati ad una serie di 6-10 PAR di intensità crescente comprese generalmente tra 0 e $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ consentono la costruzione di una curva PE.

Per ottenere una misura accurata e precisa, è necessario che il campione ed il campo luminoso nella cuvetta siano omogenei. Dal momento che il campione tende a sedimentare durante il corso della misura, tutti i fluorimetri a impulsi modulati sono dotati di un agitatore magnetico con cui mescolare la sospensione algale. Tuttavia Cosgrove e Borowitz (2006) suggeriscono di usare l'agitatore magnetico con cautela, eventualmente solo per brevi periodi in quanto, in presenza di un gradiente verticale di luce nella cuvetta, l'agitatore aumenterebbe l'eterogeneità del campo luminoso sperimentato dalla sospensione, causando la sovrastima di F_t e F_m' .

La durata dell'acclimatazione/esposizione del campione a ciascuna luce attinica è variabile: generalmente è compresa tra 10 secondi (si parla allora di $\text{RLC} = \text{Rapid Light Curve}$, White e Critchley, 1999) e 5 minuti. Dopo ogni impulso saturante, la fluorescenza massima (F_m o F_m') decade progressivamente fino ad un valore stazionario (F_0 o F_t) per mezzo dei meccanismi di quenching non-fotochimico (NPQ), che procedono con cinetiche di rilassamento di durata variabile. In particolare il q_E (*energy-dependent quenching*) si completa nell'arco di pochi secondi dalla saturazione, il q_T (*state-transition quenching*) entro pochi minuti (Müller *et al.*, 2001). La scelta del tempo di acclimatazione determina il momento dell'interruzione del rilassamento, quindi, la determinazione del valore di fluorescenza considerato stazionario (F_t). Entro i 10 secondi solo il q_E si è completato, mentre gli altri processi di NPQ sono ancora in atto; di contro, dopo 5 minuti il rilassamento si è quasi completamente realizzato, perciò solo se il tempo di acclimatazione scelto è sufficientemente lungo il valore di fluorescenza misurato può considerarsi effettivamente stazionario. Alle diverse intensità di luce attinica, questi meccanismi si sommano ai meccanismi di quenching fotochimico per cui, variare l'intervallo di tempo tra due impulsi equivale a interrompere tutti i meccanismi di quenching in momenti diversi della cinetica. Questo si traduce, in pratica,

in un segnale più stabile ad un tempo di acclimatazione maggiore. Di conseguenza va notato che le curve PE misurate su uno stesso campione con intervalli di acclimatazione diversa, hanno generalmente forma diversa.

I parametri fotosintetici così ottenuti indicano sia la capacità di quel campione di rispondere alla diversa velocità di variazione del fattore luce, sia l'efficienza dell'NPQ. La scelta del tempo di acclimatazione deve essere fatta sulla base della scala temporale delle variazioni del campo luminoso naturale che si intendono riprodurre. Bisogna considerare infatti che, in condizioni naturali, la dinamica della colonna d'acqua, le variazioni dell'altezza del sole e della copertura nuvolosa possono produrre variazioni del fattore luce nella scala temporale che va dalle ore ai minuti, fino ai secondi.

31.4 VALUTAZIONI CRITICHE

Le misure di fluorescenza variabile modulata come già detto sono specifiche per i fotoautotrofi (Falkowski e Raven, 1997) al contrario nei metodi per scambio gassoso bisogna tener presente che, *in situ*, le misure della concentrazione di O₂ e CO₂ disciolti non sono solo il risultato dell'attività dei produttori primari. Questo limite al confronto può essere superato effettuando le stesse misure su colture fitoplanctoniche axeniche, anche se resta il problema di stimare separatamente respirazione e fotorespirazione (Hunt, 2002).

Per indurre la fluorescenza è sufficiente utilizzare una fonte monocromatica (Kirk, 1994). La misura è rapida, non invasiva, infatti uno stesso campione può essere riacclimatato al buio e riutilizzato per più curve PE (anche se andrà considerata una eventuale diversa interpretazione delle misure, che dipenderà dal tempo intercorso tra le stesse) infine è più sensibile dei metodi ossimetrici. Secondo il costruttore è infatti impiegabile fino a concentrazioni di clorofilla di 0,1 µg l⁻¹, a seconda del modello di fluorimetro (es. WATER-PAM) e di rilevatore (PM) utilizzati (<http://www.walz.com/support/downloads/pdfs/pam-table.pdf>, Walz). Tuttavia, per la nostra esperienza, il limite di concentrazione indicato dal costruttore va considerato valido, per le sole misure di Fv/Fm sui campioni adattati al buio, mentre per la misura di curve PE complete le concentrazioni devono essere da 10 a 100 volte più alte. A questo proposito può essere utilizzata la tecnica di concentrazione descritta per la spettrofluorimetria *in vivo* in Massi e Lazzara (Capitolo 35).

La forma del grafico P-E ad alta PAR può discostarsi da quella teorica, a causa di valori di ETR molto variabili, che oscillano ben al di sopra o al di sotto della curva attesa (quella estrapolabile dai soli valori a bassa PAR). Ciò è dovuto anche alla amplificazione implicita nella modalità di calcolo (= Y*PAR): valori di Y bassi e variabili abbinati ai valori di PAR maggiori. Nei popolamenti naturali inoltre questa variabilità può essere dovuta all'eterogeneità del campione. La conseguenza più immediata di queste oscillazioni è la difficile determinazione del parametro di fotoinibizione, (Platt *et al.*, 1980). Per una stima di ETRmax è preferibile tracciare la migliore curva PE per interpolazione grafica o analitica (con curve polinomiali di ordine variabile) o calcolando la migliore approssimazione statistica alla curva tangente iperbolica (Jassby e Platt, 1976) includendo eventualmente anche il parametro di fotoinibizione ().

Se si confrontano i tassi fotosintetici da misure di scambio gassoso (carbonio fissato e/o ossigeno prodotto) con quelli da fluorescenza variabile, limitandosi ai valori della zona di fotolimitazione e fotosaturazione delle curve PE si osserva solitamente una forte covariazione ovvero una correlazione lineare, tra ETR e P^B (¹⁴C) così come tra ETR e P^B (O₂) (con r² compresi tra 0,87 e 0,97; Fani e Lazzara, 2006; Carr e Björk, 2003). In genere alle alte PAR, invece, i valori di tasso fotosintetico misurati coi metodi di scambio gassoso sono inferiori ai valori dei tassi misurati per fluorescenza variabile, sia in specie fitoplanctoniche (Hartig *et al.*, 1998; Geel *et al.*, 1997; Masojídek *et al.*, 2001) sia in macroalghe (Carr e Björk, 2003). La causa è da ricercarsi nei meccanismi di quenching non fotochimico (NPQ) che, ad alta intensità luminosa, costituiscono una trappola per gli elettroni alternativa alla catena di trasporto non ciclico, riducendo il danno

potenziale dovuto all'assorbimento di luce in eccesso: il flusso elettronico ciclico al PSII, la reazione di Mehler (Falkowski e Raven, 1997; Flameling e Kromkamp, 1998; Masojídek *et al.*, 2001), la EPIR (*Enhanced Post-Illumination Respiration*, Gilbert *et al.*, 2000) e i meccanismi di riduzione dell'azoto (Hartig *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2000; Maxwell e Johnson, 2000).

È possibile comunque anche misurare ad alta PAR valori di ETR relativo inferiori ai corrispondenti valori di produzione di ossigeno (Fani e Lazzara, 2006). Carr e Björk (2003) e Beer e Axelsson (2004) ipotizzano che questo si verifichi quando il tempo di acclimatazione scelto è insufficiente a determinare il completo rilassamento della cinetica da F_m a F_t , con la conseguente sottostima di Y . Questa sottostima sarebbe dunque strettamente legata alla modalità di utilizzo del fluorimetro PAM e quindi indipendente dalla specie in esame.

Il confronto dei tassi misurati per scambio gassoso con i tassi per fluorescenza variabile consente, dunque, di evidenziare i meccanismi di quenching relativi alla fase di fotoinibizione ed anche di quantificarne gli effetti, per cui è evidente che i due tipi di metodo sono da considerare complementari.

31.5 BIBLIOGRAFIA

- BEER S., AXELSSON L. (2004) – Limitations in the use of PAM fluorometry for measuring photosynthetic rates of macroalgae at high irradiances. *Eur. J. Phycol.*, **39**: 1-7.
- BILGER W., BJÖRKMAN O. (1990) – Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.*, **25**: 173-186.
- CARR H., BJÖRK M. (2003) – A methodological comparison of photosynthetic oxygen evolution and estimated electron transport rate in tropical *Ulva* (Chlorophyceae) species under different light and inorganic carbon conditions. *J. Phycol.*, **39**: 1125 – 1131.
- COSGROVE J., BOROWITZA M. (2006) - Applying Pulse Amplitude Modulation (PAM) fluorometry to microalgae suspensions: stirring potentially impacts fluorescence. *Photosynth. Res.*, **88**: 343-350.
- FALKOWSKI P. G., RAVEN J. (1997) – *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford: 375 pp.
- FANI F., LAZZARA L. (2006) - Parametri fotosintetici di microalghe planctoniche, per via fluorimetrica e ossimetrica, per la stima della produzione primaria pelagica. *Atti XVI Congr. Naz. Società Italiana di Ecologia*, Cambiamenti globali, diversità ecologica e sostenibilità. Viterbo, 19-22 Settembre 2006 (<http://www.ecologia.it/congressi/XVI/articles/fani-290.pdf>).
- FLAMELING I. A., KROMKAMP J. (1998) – Light dependence of quantum yields for PSII charge separation and oxygen evolution in eucaryotic algae. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 284-297.
- GEEL C., VERSLUIS W., SNEL J. F. H. (1997) – Estimation of oxygen evolution by marine phytoplankton from measurement of the efficiency of Photosystem II electron flow. *Photosynth. Res.*, **51**: 61-70.
- GEIDER R. J., OSBORNE B. A. (1992) – *Algal photosynthesis*. Chapman and Hall, New York: 256 pp.
- GENTY B., BRIANTAIS J.M., BAKER N.R. (1989) – The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Bioch. Biophys. Acta.*, **990**: 87-92.
- GILBERT M., WILHELM C., RICHTER M. (2000) – Bio-optical modelling of oxygen evolution using in vivo fluorescence: comparison of measured and calculated photosynthesis/irradiance (P/I) curves in four representative phytoplankton species. *J. Plant Physiol.*, **157**: 307 – 314.
- HARTIG P., WOLFSTEIN K., LIPPEMEIER S., COLIJN F. (1998) - Photosynthetic activity of natural microphytobentos populations measured by fluorescence (PAM) and ^{14}C -tracer methods: a comparison. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **166**: 53-62.
- HUNT S. (2002) – Measurements of photosynthesis and respiration in plants. *Physiol. Plantarum*, **117**: 314 – 325.
- JASSBY A.D., PLATT T. (1976) - Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **21**: 540-547.
- KAUTSKY H., APPEL W., AMANN H. (1960) – Chlorophyll fluoreszenz und kohlenzure assimilation. *Biochemische Zeitschrift*, **322**: 277-292.
- KIRK J.T.O. (1994) - *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge: 509 pp.

-
- KRAUSE G.H., WEIS E. (1991) – Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**: 313-49.
- MASOJÍDEK J., GROBBELAAR J.U., PECHAR L., KOBLIZEK M. (2001) – Photosystem II electron transport rates and oxygen production in natural waterblooms of freshwater cyanobacteria during a diel cycle. *J. Plankton Res.*, **23**: 57-66.
- MAXWELL K., JOHNSON G. N. (2000) – Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, **51**: 659-668.
- MOUGET J.L., TREMBLIN G. (2002) – Suitability of the fluorescence monitoring system (FMS, Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. *Aquat. Bot.*, **74**: 219-231.
- MÜLLER P., LI X.P., NIYOGI K.K. (2001) – Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.*, 1558-1566.
- PLATT T., GALLEGOS C.L., HARRISON W.G. (1980) – Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.*, **38**: 687-701.
- ROHACEK K. (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, **40**: 13-29.
- SCHREIBER U., SCHLIWA U., BILGER W. (1986) – Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.*, **10**: 51-62.
- SCHREIBER U., BILGER W., NEUBAUER C. (1995) – Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze E.D., Caldwell M.M. (eds), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Ecological Studies, vol. 100. Springer-Verlag, Berlin: 49-70.
- WHITE A.J., CRITCHLEY C. (1999) – Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynth. Res.*, **59**: 63-72.



ISBN 978-88-448-0427-5



9 788844 804275